

09/581005
526 Rec'd PCT/PTO 06 JUN 2000
113.1007

UNITED STATES PATENT & TRADEMARK OFFICE

Application of: VON EICHEL-STREIBER, Christoph, et al.
Serial No.: To Be Assigned
Filed: Simultaneously Herewith
For: **TCG METHOD FOR INDUCING TARGETED SOMATIC
TRANSGENESIS**

LETTER RE: PRIORITY

Box: PCT
Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

June 6, 2000

Sir:

Applicants hereby claim priority of German Patent Application No. 19754938.1, filed
December 11, 1997, through International Application Serial No. PCT/EP98/08096, filed
December 11, 1998.

Respectfully submitted,

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL, LLC

By 

William C. Gehris
Reg. No. 38,156

Davidson, Davidson & Kappel, LLC
1140 Avenue of the Americas, 15th Floor
New York, New York 10036
(212) 997-1028

"Express Mail" mailing label no. EL 515 149 072 US

Date of Deposit: June 6, 2000

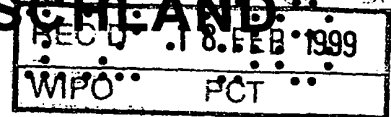
I hereby certify that this correspondence and/or documents
referred to as attached therein and/or fee are being deposited
with the United States Postal Service "Express Mail Post Office
to Addressee" service under 37 CFR 1.10 on the date indicated
above, in an envelope addressed to: "Assistant Commissioner
for Patents, Washington, D.C. 20231".

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL, LLC

By: 



EP98/08096



09/581005



Bescheinigung

Die Herren Professor Dr. Trinad Chakraborty in
Gießen/Deutschland und Dr. Christoph von Eichel-
streiber in Schweppenhausen/Deutschland haben eine
Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerich-
teten, somatischen Transgenität"

am 11. Dezember 1997 beim Deutschen Patent- und Markenamt
eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vor-
läufig die Symbole C 12 N und A 01 K der Internationalen
Patentklassifikation erhalten.

München, den 17. Dezember 1998
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

tenzeichen: 197 54 938.1

Agurks

M 30.12.96

- 1 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

5 **TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität**

15 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität (TGC = targeted genetic conditioning), das zur Expression von Fremdproteinen in Zellen, einem Gewebe, einem Organ oder einem ganzen Wirtsorganismus sowie zur somatischen Gentherapie eingesetzt wird.

20 Es ist bekannt, daß Proteine für technische Anwendungen oder für therapeutische Zwecke durch den Transfer von Genen in Mikroorganismen oder Säugetierzellen in ausreichenden Mengen exprimiert werden können. Diese Verfahren sind besonders bedeutsam für körpereigene Proteine, die sonst nicht oder nur begrenzt zugänglich sind, wie Hormone, Regulationsfaktoren, Enzyme, Enzyminhibitoren und humanisierte monoklonale Antikörper sowie für die Herstellung von Oberflächenproteinen pathogener Mikroorganismen oder viraler Hüllproteine zur
25 gefahrlosen Herstellung diagnostischer Tests und verträglicher Impfstoffe. Durch "Protein-Engineering" können auch neuartige Proteine hergestellt werden, die durch Fusion, Mutation oder Deletion entsprechender DNA-Sequenzen anwendungsspezifischere
30 Eigenschaften erhalten, zum Beispiel Immuntoxine.

35 Aus menschlichen Zellen gewonnene Gene sind auch in Maus-, Ratten- oder Schafzellen funktionsfähig und führen dort zur Bildung entsprechender Genprodukte. Dies wurde bereits praktisch bei der Herstellung von therapeutischen Proteinen,

M 30.12.99

- 2 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

zum Beispiel in der Milch transgener Nutztiere, angewendet. Der bisher bekannte Weg hierfür ist die Mikroinjektion entsprechender Fremd-DNA-tragender Vektoren in den Kern der befruchteten Eizelle, in der bei einer Ausbeute von 1% die DNA dann in das Chromosom eingebaut wird. Die transgene befruchtete Eizelle wird anschließend hormonell stimulierten Muttertieren reimplantiert. Ein Nachkomme, der das eingeschleuste Gen in allen Körperzellen trägt, ist die Grundlage für die Bildung einer "transgenen Herde". Durch die Nutzung der Gentechnik ist es möglich geworden, landwirtschaftliche Nutztiere so gezielt zu verändern, daß sie menschliche Proteine in ihrem Blut, ihrem Gewebe oder der Milch produzieren, die in Mikroorganismen oder Pflanzen nicht hergestellt werden können.

15

Der Einsatz von transgenen Tieren als Proteinproduktionsfabriken hat jedoch den entscheidenden Nachteil, daß hierzu ein Eingriff in die Keimbahn der Tiere erforderlich ist. Wegen des hohen technischen und zeitlichen Aufwandes zur Schaffung und Züchtung von transgenen Tieren als auch wegen der Diskussion über die ethischen Konsequenzen dieser Methoden wären alternative Methoden zur Proteinproduktion in einem animalen Wirt ohne Keimbahneingriff von sehr großem Vorteil.

20

Es ist weiterhin bekannt, daß die Milch von Säugetieren wie Kühen, Schafen, Ziegen, Pferden oder Schweinen eine Reihe von bakteriellen Krankheitserregern enthalten kann. Darunter sind Listerien, Mykobakterien, Brucellen, Rhodococcus, Salmonellen, Shigellen, Escherichia, Aeromonaden und Yersinien, oder generell Bakterien mit interzellulärem Lebensstil [1, 2]. Diese Bakterien werden im wesentlichen durch orale Aufnahme auf den Menschen oder das Tier übertragen [3], aber auch Tröpfcheninfektionen spielen eine Rolle. Eine Hauptquelle für die Infektion des Menschen mit Listerien [4], Mykobakterien [5] und Escherichia coli ist kontaminierte Milch [6], der die

30

35



Bakterien beim Verzehr nicht pasteurisierter Milch oder Milchprodukte zu sich nimmt. Die anderen oben aufgeführten Bakteriengattungen wie Salmonellen, Shigellen, Versinien, Rhodococcus und Brucellen werden in ähnlicher Weise auf den Menschen übertragen. Bakterien können aber auch durch andere mit Bakterien infizierte Tierprodukte aus der Kuh, der Ziege, dem Schaf, dem Hasen, dem Pferd, dem Schwein oder dem Geflügel in den Menschen gelangen.

Die Infektion der Tiere erfolgt dabei über mukosale Oberflächen, sehr häufig über den Verdauungstrakt. Nach der Aufnahme von Bakterien werden zum Beispiel im Fall von Listerien jedoch nicht alle Gewebe symptomatisch infiziert. Bei der Kuh und bei der Ziege steht die Infektion von Euter, Milz und Leber im Vordergrund des Infektionsgeschehens. Bei Schafen kann es außerdem auch zur Erkrankung des zentralen Nervensystems in Form der Meningitis kommen, so daß nicht alle Tiere die Infektion überleben. Mit der Infektion des Euters ist dann die Infektionskette geschlossen. Mit kontaminierter Milch aufgenommene Bakterien können dann das Tier, zum Beispiel das saugende Kalb, oder den Menschen über den Verdauungstrakt neu infizieren.

Über den Weg der bakteriellen Infektion des Menschen, dargestellt am Beispiel der Listerien, ist derzeit folgendes bekannt: Für den Menschen sind von den sechs bekannten Listeria-Spezies lediglich *L.monocytogenes* und *L.ivanovii* [7] pathogen. Die Erkrankung des Menschen erfolgt beim Verzehr infizierter Milch oder Milchprodukte. Der Verlauf der Infektion hängt vom Gesundheitszustand des Menschen ab und ist in aller Regel undramatisch. In der Schwangerschaft kann es zu der intrauterinen Übertragung des Keims auf den Fetus kommen, verbunden mit Fehl-, Tod- oder Frühgeburten. In allen Fällen besteht eine exzellente und problemlose Behandelbarkeit mit Antibiotika wie Ampicillin oder Erythromycin [8].

M 30 12 99

- 4 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

Für *L.monocytogenes* in Mensch und Tier, für *L.Ivanovii* im Schaf, ist der Weg in die Zelle gut definiert. Zur vollen Pathogenität der Listerien sind eine Reihe von Pathogenitätsfaktoren notwendig. Dazu gehört *prfA* (positive regulator of virulence), *actA* (actin nucleating protein), *plcA* (phosphatidylinositol-specific phospholipase), *plcB* (phosphatidylcholine-specific phospholipase), *hly* (listeriolysin), *mpl* (metalloprotease) [9]. Die Zellspezifität der Pathogen-Wirtszelle-Interaktion wird über eine Reihe von Proteinen vermittelt. Dazu gehören die Internaline *inlA* und *inlB*, die am initialen Kontakt und der Interaktion von Bakterien und Zelloberfläche beteiligt sind [10, 11]. *L.monocytogenes* kann in der experimentellen Situation unter anderem Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten und Hepatozyten infizieren. Darüber hinaus infiziert *L.monocytogenes* mit neutrophilen Granulocyten, Makrophagen und Lymphozyten auch Zellen des weißen Blutbildes. Dies ist ein wesentlicher Faktor bei der Übertragung der Bakterien von der Eintrittspforte zum Zielorgan im Wirt.

20

Nach der Adhäsion an der Zelloberfläche wird *L.monocytogenes* durch Endozytose in die Zelle eingeschleust, zerstört unter der Einwirkung von Listeriolysin (*hly*) die Endosomenmembran und wird so in das Zellzytosol freigesetzt [14]. In der Zelle angekommen, kann sich der Keim vermehren. Unter der Produktion weiterer Proteine bleibt das vollpathogene Bakterium nicht ortsständig, sondern bewegt sich aktiv fort. Die Fortbewegung wird durch die Ausnutzung einer Reihe von *L.monocytogenes* eigenen und einiger zelleigener Proteine bewerkstelligt [15, 16]. *ActA* wird auf der Zelloberfläche der *L.monocytogenes* exprimiert. Es bindet das zelluläre Protein VASP, das seinerseits die Brücke zur Anheftung von zellulären Aktin bildet. Im weiteren Verlauf bilden sich Aktinschweife aus, die das Bakterium an seiner Spitze tragen und es so durch die Zelle weiterbewegen. Trifft *L.monocytogenes* auf die Zellmem-

11.30.12.97

- 5 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

bran, so entsteht eine Membranprotrusion, die bei benachbarten Zellen direkt in die Nachbarzelle hineinragt. Diese Ausstülpung wird dann von der Nachbarzelle endozytiert, so daß L.monocytogenes sich in der neuen Zelle innerhalb einer zweifachen Membran befindet. Die beiden Membranen werden unter 5 Einwirkung von hly und plcB aufgelöst [17]. Am Ende dieses Vorganges hat L.monocytogenes auch die Nachbarzelle infiziert und der Injektionsprozeß beginnt von Neuem. So gelangt L.monocytogenes unter anderem in die sekretorischen Zellen des Euters wie der Kuh. Sekretierte Listerienproteine werden in der Milch nachweisbar, d.h. sie werden intrazellulär aus der laktierenden Zelle in die Milch abgegeben [18]. Zu diesen Proteinen zählen mit hly (Listeriolysin) und irpA (internalin 15 related protein [19]) zwei Pathogenitätsfaktoren, die von L.monocytogenes im Wirt in großen Mengen produziert, sezerniert und in die Milch ausgeschieden werden [20].

Diese Kenntnisse des Infektionsprozesses haben es ermöglicht, L.monocytogenes genetisch so zu verändern, daß er fremde 20 Proteine exprimiert. Beispiele für die Expression fremder Proteine in L.monocytogenes sind: Alkalische Phosphatase aus Escherichia coli, das Nucleoprotein aus dem Lymphochoriomeningitis virus (LCMV), das Nucleoprotein aus dem Influenza virus, das "major capsid protein" (L1) aus cottontail rabbit 25 papillomavirus (CRPV) und das Gag Protein aus HIV Typ 1 [20 bis 27].

Neben Proteinen prokaryonten Ursprungs handelt es sich hierbei um virale Proteine, die normalerweise nicht innerhalb der 30 eukaryonten Zelle produziert werden. Solche und ähnliche Fremdproteine prokaryonten und eukaryonten Ursprungs können von L.monocytogenes produziert werden, ohne das eine eukaryonte Zelle dazu notwendig ist. Von L.monocytogenes produzierten Proteine werden in der Milch ausgeschieden.

M 3. 12. 98

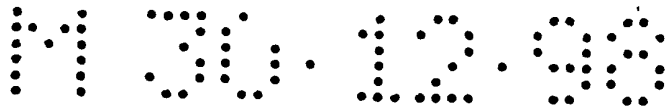
- 6 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

Die Infektion durch Bakterien erfolgt durch spezifische Interaktionen von Liganden-Proteinen der Bakterien mit Rezeptor-Proteinen der Zielzellen. Hieran ist im Falle von *L.monocytogenes* die Internalinfamilie maßgeblich beteiligt; sie bestimmt im wesentlichen die Zellspezifität des Infektionsprozesses [28]. Zudem wird eine ActA abhängige Zellaufnahme diskutiert, die über Rezeptoren der Heparansulfatfamilie vermittelt wird [29]. Infiziert *L.monocytogenes* die Zelle, so kommt es nicht in jedem Fall zu einem vollen Infektionszyklus. Wird in *L.monocytogenes* Listeriolysin ausgeschaltet, so bleiben die Bakterien im Endosom stecken und die Infektion der "ersten Zelle" kommt nicht zu Stande. Bakterien, in denen das Protein actA ausgeschaltet, inaktiv oder nicht mehr vorhanden ist, kommen in die erstinfizierten Zellen, bleiben aber dort stecken und können die Nachbarzellen nicht mehr infizieren [30, 31]. Bei der Ausschaltung der *pclB* ist der Keim nicht mehr in der Lage, sich in einer zweiten Zelle zu etablieren.

L.monocytogenes ist ein Bakterium, das durch eine Reihe von Antibiotika behandelt werden kann. Besonders geeignet sind Ampicillin und Penicillin (jeweils in Kombination mit Gentamycin). Als Alternative werden auch Erythromycin und Sulfonamide eingesetzt. In besonderen Fällen kommen Tetracykline, Vancomycin oder Chloramphenicol zum Einsatz [32]. Entsprechende Behandlungsmöglichkeiten bestehen auch für andere Bakterien der Gattungen *Aeromonas*, *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Enterobacteriaceae*, *Mycobacterium*, *Renibacterium*, *Rhodococcus* oder andere Bakterien, die mit dem genannten Bakterien genetisch oder biochemisch verwandt sind.

Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse stellte sich nun die Aufgabe, eine bakterielle Infektion für ein Verfahren zur organotropen Proteinproduktion zu nutzen.



Gelöst wird diese Aufgabe durch ein TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität, bei dem Bakterien, die eine Fremd-DNA tragen, welche in einem episomalen Vektor integriert und zur späteren Transkription und Expression vorbereitet ist, bei der Infektion von Zellen, Geweben, einem Organ, dem ganzen Wirtsorganismus oder einem Organ in einer Kultur ihre genetischen Informationen in die infizierte Einzelzelle freisetzen und damit die Expression von Fremdprotein bewirken.

Dieses Verfahren kann entweder zur Gewinnung des Fremdproteins eingesetzt werden, dient aber vorteilhaft auch zur somatischen Gentherapie, bei der die durch die bakterielle Infektion in den Wirtsorganismus eingeführte Fremd-DNA dort die Bildung eines dem Wirtsorganismus fehlenden Proteins veranlaßt oder durch die Erzeugung von einzel- oder doppelsträngiger Nukleinsäure die Bildung eines Proteins im Wirtsorganismus erhöht, vermindert oder verhindert. Dieses Verfahren kann auf alle bekannten Nutztiere und auch auf den Menschen angewendet werden.

Handelt es sich bei dem infizierten Gewebe um das Ei eines Geflügeltieres, so wird das Fremdprotein im Ei produziert und kann aus diesem durch die bekannten Verfahren der Isolierung von Proteinen, zum Beispiel aus Hühnereiern, isoliert werden. Handelt es bei den infizierten Zellen um Zellen des Blutes, so kann durch parenterale Injektion der Zellen eine Verbreitung der Bakterien und mit ihnen der Fremd-DNA im injizierten Gesamtorganismus erzielt werden. Handelt es sich bei den Wirtstieren um Versuchstiere, deren infiziertes Organ ein Euter ist, so wird in der Milch des Versuchstieres das gewünschte Fremdprotein produziert, aus der das Fremd-Protein dann isoliert werden kann.

M 30.12.98

- 8 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

Das TGC-Verfahren wird exemplarisch für das Bakterium *L.monocytogenes* besprochen. Es kann entsprechend aber auch bei allen intrazellulär wachsenden Bakterien angewendet werden, unter denen die Bakterien der Gattungen *Aeromonas*, *Bartonella*,
5 *Brucella*, *Campylobacter*, *Clostridia*, *Enterobacteriaceae* bei letzterer insbesondere Bakterien der Spezies *Yersinia*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*), *Mycobacterium*, *Renibacterium*, *Rhodococcus* oder Bakterien aus mit ihnen genetisch oder biochemisch verwandten Gattungen hervorzuheben sind, obwohl auch andere Bakterien-Gattungen für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet sind.

Es ist außerdem möglich, das TGC-Verfahren mit von Hause aus apathogenen Bakterien durchzuführen, die durch genetische
15 Manipulationen mit zusätzlichen Faktoren ausgestattet werden, die ihnen den Zutritt zur Zelle ermöglichen. Zu einer derartigen "Aufrüstung mit Pathogenitätsfaktoren" können viele von Hause aus nicht intrazellulär wachsende Bakterien herangezogen werden, wie *Bacillus subtilis*, *Lactobacillen*,
20 *Pseudomonaden*, *Staphylokokken*. Ein in diesem Sinn aufgerüsteter TGC-Sicherheitsstamm ist zum Beispiel *Bacillus subtilis*, der zusätzlich mit dem *Listeriolysin* aus *L.monocytogenes* ausgerüstet ist.

25 Das TGC-Verfahren wird in folgenden Schritten durchgeführt:

a) Klonierung der TGC-(Fremd)-DNA:

Das TGC-Verfahren wird durch die Vorbereitung des *L.monocytogenes*stammes im Labor eingeleitet. In einen geeigneten Vektor
30 wird die cDNA für das herzustellende Fremdprotein inseriert. Die Einfügung der cDNA wird dabei in bekannter Weise so vorgenommen, daß die spätere Transkription und Expression im eukaryontischen Wirt sichergestellt ist. Soll das Protein von
35 der Zelle sekretiert werden, so müssen die Vektoren passende,

M 30.12.98

- 9 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

wirtszellspezifische Signalsequenzen enthalten. Beim Vektor kann es sich um einen eukaryonten Vektor handeln, der käuflich zu erwerben ist, zum Beispiel um pCMV der Firma Clontech oder um pCMD der Firma Invitrogen. Als wesentliche Kriterien der Auswahlvektoren weisen diese eukaryonte Promotoren, Donor und Akzeptorstellen für das RNA-Splicing auf, sowie eine Polyadenylierungsstelle zum Beispiel aus SV40. Zur Vervielfältigung der DNA kann die Produktion der genetischen Konstrukte (im folgenden als TGC-DNA bezeichnet) in E. coli oder jedem anderen geeigneten Wirtstamm nach Methoden vorgenommen werden, die jedem Fachmann geläufig sind. Die TGC-DNA muß zur primären Klonierung lediglich in die ausgewählten Bakterien eingebracht und dann später in den ausgewählten bakteriellen TGC-Sicherheitsstamm transferiert werden können. Der Transfer in L.monocytogenes kann mit den verschiedenen, wohl bekannten Methoden des Gentransfers von isolierter DNA (Transformation, Elektroporation etc.) oder durch die Vorgänge der Konjugation und der Transduktion direkt oder mittelbar von Bakterium zu Bakterium vorgenommen werden.

b) TGC-Sicherheitsstämme als Rezipienten der TGC-DNA:

Als Rezipient der TGC-DNA werden besondere L.monocytogenes Wirtsstämme eingesetzt, die folgende einzelne oder kombinierte Eigenschaften erfüllen:

- (i) sie eignen sich als Empfänger fremder DNA;
- (ii) sie sind "genetische Krüppel", die durch gezielte, vom Experimentator eingeführte Stoffwechseldefekte nur auf definierten, artifiziellen Medien zur Anzucht gebracht werden können, aufgrund dieser Defekte aber in der Zelle und vor allem im Ganztier nicht mehr wachsen, sich also nicht vermehren können;

M 31.12.98

- 10 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

(iii) es sind attenuierte Wirtsstämme, bei denen ein Teil ihrer Pathogenitätsfaktoren deletiert oder inaktiviert ist, so daß sie nicht mehr die volle Pathogenität der Wildtypstämme entfalten;

5

(iv) die Bakterien tragen Suizidgene, die erst nach dem Eindringen in die Wirtszelle konditional aktiviert werden, so daß die Bakterien sich selbst umbringen;

(v) sie sind durch Antibiotikabehandlung des späteren animalen Wirts zu eliminieren;

(vi) sie tragen Mutationen, die Gene betreffen, ohne die ein Überleben der Bakterien in der Außenwelt, also außerhalb eines Wirtes, zum Beispiel bei niedrigerer Temperatur, unmöglich ist.

15

Stämme mit diesen Eigenschaften werden als TGC-Sicherheitsstämme bezeichnet.

20

c) Optimierung der TGC-Amme auf das Zielorgan des TGC-Verfahrens:

Die TGC-DNA, die für das herzustellende Fremdprotein kodiert, wird in den TGC-Sicherheitsstamm durch Transformation, Konjugation oder Transduktion überführt. Die so erhaltenen Stämme werden nachfolgend als TGC-Amme bezeichnet. Die Amme versorgt (füttert) den TGC mit der DNA und induziert damit die somatische Transgenität. Damit während des TGC-Verfahrens das gewünschte Fremdprotein optimal exprimiert wird, sollte sich das Gen vorteilhafterweise unter der Kontrolle von Promotoren und anderen regulatorisch wirkenden Sequenzen befinden, die aus dem vorher ausgewählten Zielorgan des TGC-Verfahrens stammen oder für das Zielorgan optimiert sind (zum Beispiel Euter-spezifische Promotoren und Sekretionssignale).

25

30

35

M 30.12.98

- 11 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

d) Infektion des Wirtsorganismus mit der TGC-Amme:

Durch die Anzucht der TGC-Amme wird sie in vitro in einem Kulturmedium vermehrt und für die Durchführung des TGC-Verfahrens in einem ausgewählten Wirtsorganismus vorbereitet. Alternativ kann die TGC-Amme auch dem Wirtsorganismus, einem Menschen oder Tier, in folgenden TGC-Wirt genannt, in vivo zugeführt werden. Dazu wird die TGC-Amme in einer an den TGC-Wirt adaptierten, nicht bakteriziden Lösung, einem Puffer oder einer anderen physiologischen Flüssigkeit aufgenommen. Die Flüssigkeit wird dem TGC-Wirt, zum Beispiel dem laktierenden Säugetier, wenn das Euter somatisch transgen gemacht werden soll, verabreicht. Dies kann entweder durch Trinken der Flüssigkeit oder durch Zuführung über eine Magensonde, den Anus oder eine andere Körperöffnung erfolgen. Als Alternative kommt die Gabe der TGC-Amme durch Injektion in Betracht, die intravenös, intramuskulär direkt in das Zielorgan oder vorzugsweise intraperitoneal erfolgt.

Der TGC-Wirt (Mensch oder Nutztier: Kuh, Pferd, Ziege, Schaf, Schwein, Hase, Geflügel etc.) kann mehrmals mit gleichen oder heterologen Transgenen infiziert werden. Durch mehrmalige Infektion mit unterschiedlicher DNA, die zum Beispiel für mehrere Enzyme eines Biosyntheseweges kodieren, können auf diese Weise ganze Enzymkaskaden in dem TGC-Wirt etabliert werden. Dadurch läßt sich auch die biochemische Expression multigener Proteine erreichen.

e) Organ- und Zellspezifität der Infektion:

30

Der weitere Weg der TGC-Amme im Organismus ist zunächst durch den natürlichen Infektionsweg bestimmt. Die TGC-Amme erreicht auf dem für sie typischen Weg das Zielorgan. Trägt die TGC-Amme im Fall von *L.monocytogenes* genetisch unveränderte Internäline, so ist das Euter unter den Zielorganen. Genetisch

M 30.12.96

- 12 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

veränderte Internaline erlauben die Injektion anderer Organsysteme. Seinem Injektionszyklus entsprechend dringt die TGC-Amme in die Zellen ein und erscheint im Zytoplasma. Da sie genetisch defekt ist, kann die TGC-Amme sich dort nicht weiter vermehren. Bei der Zellinfektion hat die TGC-Amme die wirtsfremde TGC-DNA in ihrem Gepäck in die Zelle eingeschleust. Diese DNA steht nun als Template zur Produktion des gewünschten Fremdproteins zur Verfügung. Die Nukleinsäure kann aber auch direkt therapeutisch wirken, zum Beispiel als antisense RNA. Die infizierte Zelle ist dadurch somatisch transgen.

f) L.monocytogenes induzierte Proteinproduktion in der Milch von Säugetieren:

15

Nach Ausführen des TGC-Verfahrens zum Beispiel mit L.monocytogenes wird das Protein in der laktierenden Zelle gebildet und mit den anderen Produkten der Zelle in die Milch ausgeschieden. Durch Sammeln der Milch jedes einzelnen TGC-Wirtes sind unterschiedliche Proteine herstellbar.

20

Aufgrund der Eigenschaften der TGC-Amme tauchen in der Milch keine L.monocytogenes (TGC-Ammen, d.h. Bakterien) auf. Sollte dies dennoch der Fall sein, so können die Bakterien mit allen dem Fachmann bekannten Methoden eliminiert werden, zum Beispiel durch Behandlung mit Antibiotika. Die Tiere sind nach der Durchführung des "targeted genetic conditioning" (TGC) frei von lebensfähigen, gentechnisch veränderten Organismen und unterliegen damit keinen weiteren Sicherheitsbestimmungen. Der TGC-Wirt gibt die in ihn durch das TGC-Verfahren eingetragene genetische Information an die nachkommenden Zellen im Rahmen der üblichen Zellteilung weiter. Auf Abkömmlinge des TGC-Wirts wird die Information jedoch nicht übertragen, da die TGC-DNA sich nicht in der Keimbahn des TGC-Wirtes befindet.

25

30



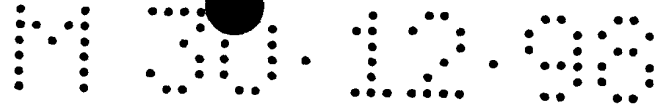
g) Infektionen von Geweben durch L.monocytogenes

Zellen des Blutes eignen sich besonders für das TGC-Verfahren. Die Infektion von Zellen des Blutes läßt sich außerhalb des Körpers vornehmen. Die zu erzielende somatische Transgenität der Zellen kann ebenfalls außerhalb des Wirtes überprüft werden. Im Fall der attenuierten Bakterien lassen sich die zum Wachstum der Zellen notwendigen Substanzen - als Beispiel dient hier die Diaminopimelinsäure - dem Medium zufügen und so der Zeitraum der Lebensfähigkeit der Bakterien entsprechend dem Versuchsziel steuern. Durch anschließende Lyse der Zellen kann dann überprüft werden, ob die intrazellulären Bakterien noch vital sind.

15 Zur Injektion in den Empfängerorganismus werden schließlich die transfizierten Zellen verwendet, die eine genau bekannte Menge an vitalen Bakterien enthalten. Im Einzelfall können dies so große Mengen an Bakterien sein, daß im Organismus weitere Organe infiziert werden. In anderen Fällen wird durch
20 die Eliminierung vitaler Bakterien die Transgenität auf das Gewebeblut beschränkt.

Die Disseminierung der transgenen Zellen mit oder ohne vitale Bakterien erlaubt eine somatische Gentherapie von Zellen im
25 Wirt, der in diesem Fall auch ein Mensch sein kann.

Das TGC-Verfahren ermöglicht es aber auch, extrakorporal Proteine zu produzieren. Dazu werden die TGC-Ammen in Eiern von Geflügeltieren injiziert. Geeignete Techniken hierfür sind
30 in der Impfstoffherstellung bei viralen Erregern bereits Stand der Technik. Im Verlauf der Bebrütung der Eier werden die Zellen im Ei infiziert, somatisch transgen und produzierten dann das Fremdprotein. Aus dem Ei läßt sich nach bekannten Verfahren das Fremdprotein aufreinigen. Bei dieser Form des
35 TGC-Verfahrens bleibt die TGC-Amme in allen Phasen der



Anwendung unter Laborbedingungen kontrollierbar. Die Menge des zu produzierenden Proteins hängt nur von der Injektion einer entsprechend großen Anzahl von Eiern ab.

5 h) Einsatz des TGC-Verfahrens zur somatische Gentherapie:

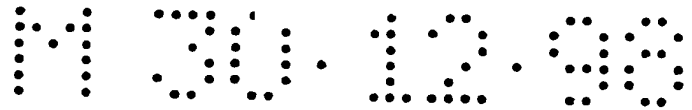
Es gibt noch keine etablierte Form der somatischen Gentherapie. Derzeit wird die zur Transfektion eingesetzte Nukleinsäure im Inneren von Viren oder eingepackt in Liposomen vor Einflüssen der Außenwelt geschützt.

Viren haben den Nachteil, das sie nur eine begrenzte Aufnahmefähigkeit haben, und daß bei hohen Infektionsdosen mit der Entwicklung ihrer vollen zytopathischen Effekte zu rechnen ist
15 [32a]. Sie induzieren Immunreaktionen und können so selber angegriffen und zerstört werden. Einige Viren werden durch Serum inaktiviert und werden dann für die Gentherapie unbrauchbar.

20 Beim Einsatz von Liposomen ist die toxische Wirkung der Lipide zu berücksichtigen, die vor entzündliche Reaktionen auslöst.

Im Fall der in vivo Therapie gibt es noch erhebliche Defizite auf dem Weg zu Anwendung der bisher benutzten Systeme des Gentransfers. Für diese Form der Therapie wird gefordert
25 [32b]:

- (i) die Resistenz des Vektors gegen Abbau nach der in vivo Gabe im Körper,
- 30 (ii) die Gewebsspezifität, d.h. das gezielte Ansteuern des zu therapierenden Gewebes (Organs) und
- (iii) die Sicherheit, womit die Unschädlichkeit der nicht
35 zu behandelnden Organe gemeint ist [BioEssays].

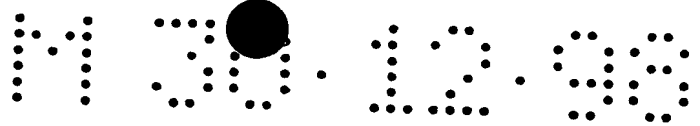


Die in dieser Patentanmeldung aufgeführten Bakterien, die hier als Vehikel zum Gentransport und Gentransfer eingesetzt werden sollen, sind idealerweise für den Gentransfer geeignet. Die Bakterien sind auf ihren jeweiligen Wirt bestens adaptiert und können in ihm ohne Therapie für eine ausreichende Zeit überleben. Sie induzieren auf definierten Infektionswegen spezifische Erkrankungen und zeigen dabei zum Teil eine ausgeprägte Organotropie. Sie können erhebliche Fremd-DNA Mengen aufnehmen (z.B. natürlich vorkommende Plasmide haben Größen von mehreren 100 Kilobasen), so daß nicht nur c-DNA's sondern sogar größere Bereiche eines Chromosoms übertragen werden können. Schließlich können sie sicher eingesetzt werden, insbesondere wenn es sich um "Krüppelbakterien" handelt, wie sie oben beschrieben worden sind. Ihre genetischen Defekte in Kombination mit der vorgegebenen Antibiotika-Empfindlichkeit garantieren eine effiziente Eliminierung der Bakterien, nachdem sie ihre Aufgabe, den DNA-Transfer in die eukaryonte Zelle erfüllt haben.

20 Beispiel:

Als Beispiele für eine somatische Gentherapie sind hier aufgeführt:

- 25 - Die Therapie der Cystischen Fibrose (CF): Dazu muß der Keim dem zu therapierenden Patienten durch Inhalation verabreicht werden. Bei dem Bakterium handelt es sich vorzugsweise um einen Keim, der über Tröpfcheninfektion übertragen wird. In dem Bakterium befindet sich das CFTR-Gen, das den bei der CF maßgeblichen Defekt kurieren kann. Das Bakterium dringt in die Säulenzellen des Luftweges (airway lumen-facing columnar cells) ein und transfiziert diese mit der CFTR-DNA integriert in den TGC-Vektor. Die Zellen werden somatisch transgen, der Defekt wird kuriert.



- Durch somatische Gentherapie mit dem humanen β -Globulingen kann die β -Thalasaemie behandelt werden. Dazu werden ex vivo Stammzellen der haematopoetischen Reihe mit einem TGC-Sicherheitsstamm infiziert, der das β -Globulingen auf die Stammzelle überträgt. Durch Behandlung der Zellen in der Zellkultur wird das infizierende Bakterium eliminiert und die transgene Zelle für die Rückübertragung auf den Menschen vorbereitet. Diese Übertragung erfolgt durch intravenöse Gabe.

5

- Bei der Therapie des Hurler Syndroms werden primitive CD34-positive Zellen des Knochenmarks mit dem α -L-Iduronidase-Gen transfiziert. Der Weg der Gentherapie und der Rückübertragung der Zellen auf den Patienten entspricht dem im vorherigen Punkt.

15

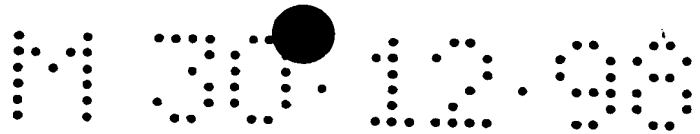
- Bei der Gentherapie der Fanconi Anaemie wird das Gen der Fanconi Anaemie Komplementationsgruppe C (FACC) zur somatischen Gentherapie eingesetzt. Zielzellen der Infektion mit der TGC-Amme sind hierbei erneut CD34-positive Zellen des Knochenmarks.

20

i) Nachweis des Erfolges des TGC-Verfahrens

25 Der DNA-Transfer wird in der Maus bereits innerhalb der ersten 24 Stunden sichtbar, d.h. lange bevor eine spezifische Immunantwort gegen das Bakterium entstanden sein konnte. Gezeigt wurde dies durch die Produktion von β -Galactosidase in Zellkulturen innerhalb von 24 Stunden. Der im Rahmen der Infektion zusätzlich auftretende "mitogene Effekt der Bakterien" begünstigt die Etablierung der DNA in der TGC-Zelle und ist damit erwünscht und für den Erfolg des TGC-Verfahrens vorteilhaft.

30



Zusammenfassend ist deshalb festzustellen, daß der Einsatz von Bakterien zur somatischen Gentherapie sicherer ist als die Gentherapie mit viralen Systemen. Die bakterielle Infektion kann gerichtet und örtlich begrenzt werden. Das Wachstum und damit die floride Infektion durch die Bakterien kann durch Ausschalten bestimmter bakterieller Faktoren verhindert werden. Außerdem kann das Wachstum der Bakterien in der eukaryonten Zelle genau beeinflußt und generell verhindert werden. Schließlich ist die Beendigung der bakteriellen Infektion durch den Einsatz von Antibiotika jederzeit möglich, d.h. die Infektion läßt sich örtlich, zeitlich und effektiv begrenzen.

Im folgenden wird am Beispiel von *L.monocytogenes* die Erfindung detailliert beschrieben:

Beispiel 1 - Die Herstellung von TGC-Sicherheitsstämmen

Die *L.monocytogenes* Sicherheitsstämme werden durch gezielte genetische Veränderungen von primär pathogenen *L.monocytogenes* Stämmen hergestellt. Dabei werden mehrere Ebenen der Sicherheit parallel zueinander etabliert. Damit wird verhindert, daß durch Rückmutationen die Vitalität oder Pathogenität wieder entstehen können. Die Mutationen betreffen Gene, die (1) das Überleben der Bakterien in der Zelle beeinflussen, (2) die die Pathogenität der Bakterien im TGC-Wirt mindern und (3) die das Überleben der Bakterien in der Umwelt nach einer möglichen Ausscheidung verhindern.

30

a) Überleben in der Zelle: 1. Ebene der Sicherheit

Allgemein zeichnen sich die für das TGC-Verfahren attenuierten Bakterien durch definierte Deletionen in den Genen aus, die für die Biosynthese integraler bakterieller Komponenten

essentiell sind. Die ausgewählten auxotrophen Bakterien eignen sich als TGC-Amme, denn als attenuierte Bakterien können sie fremde DNA in die Zelle transportieren. Da die Bakterien jedoch in den Zellen von essentiellen "Wachstumsfaktoren" abgeschnitten sind, lysieren sie spontan und setzen dabei die TGC-DNA in der Zelle frei.

Als TGC-Sicherheitsstämme werden *L.monocytogenes* eingesetzt, die genetisch derart verändert sind, daß sie die Zelle zwar noch infizieren, sich aber in der Zelle nicht mehr vermehren können. Dies wird durch die Inaktivierung des *dapE*-Gens in *L.monocytogenes* erreicht. Listerien sind Gram-positive Bakterien, die ebenso wie die Gram-negative Bakterien zur Vernetzung der Zellwand meso-Diaminopimelinsäurederivate (DAP) benötigen. Die Biosynthese von Diaminopimelinsäure ist daher für die Bildung der bakteriellen Zellwand essentiell. DAP-auxotrophe Bakterien unterliegen der spontanen Lyse, wenn diese Aminosäure im KulturmEDIUM nicht mehr angeboten wird. Die Enzyme, die bei der DAP-Synthese im Bakterium beteiligt sind, sind in Säugerzellen nicht vorhanden. In TGC-Sicherheitsbakterien sind eben diese Enzyme deletiert oder durch Insertionen oder auf eine andere Weise inaktiviert. Das *dapE* von *L.monocytogenes*, das in den erfindungsgemäß eingesetzten Sicherheitsstämmen inaktiviert wurde, ist im Sequenzprotokoll als SEQ. ID No. 1 dargestellt.

Die dieses oder anderer Gene des DAP-Biosyntheseweges beraubten Bakterien, sog. DAP-Mutanten, können weder innerhalb noch außerhalb des Wirtes wachsen. Dazu benötigen sie den Zusatz von großen Mengen an DAP (1mM) zum Wachstumsmedium. Fehlt es an DAP, kann das Bakterium weder im TGC-Wirt noch außerhalb des TGC-Wirts überleben. Damit bieten diese DAP-Mutanten sowohl Sicherheit vor einer bakteriellen Infektion des TGC-Wirtes als auch Sicherheit vor einer Infektion anderer

Organismen im Falle der Freisetzung eines derartigen Stammes in die Außenwelt.

Es sind auch noch andere attenuierte Mutationen von *L. monocytogenes* bekannt, in denen die Biosynthese von Nukleinsäuren, Aminosäuren, Zuckern oder anderen Zellwandbausteinen blockiert ist [33 bis 35]. Gleiches kann auch durch Mutationen in regulatorischen Genen erreicht werden, die für den intrazellulären Lebensstil der Bakterien essentiell sind. Beispielshaft für ein derartiges Gen ist *phoP* von *Salmonella typhimurium* [36].

Als Suizid-Gene, die nach dem Eindringen in die Wirtszelle aktiviert werden und zum Absterben der Bakterien führen, können die Bakterien mit Lysisgenen aus Bakteriophagen, zum Beispiel mit dem S-Gen des Bakteriophagen Lambda oder Analoga [37], oder mit Killergenen aus Plasmiden [38] ausgestattet werden, die unter der Kontrolle eines intrazellulär induzierbaren Promotors (zum Beispiel *pagC*-Promotor aus *Salmonella* [38]) stehen.

b) Zweite Ebene der Sicherheit - verminderte Pathogenität

Die zweite Ebene der Attenuierung der TGC-Sicherheitsstämme umfaßt Mutationen in den Pathogenitätsfaktoren. Durch gezielte Mutationen in definierten Faktoren wird die Pathogenität der Bakterien abgeschwächt, die Apoptoseinduktion der infizierten Wirtszelle verhindert und gleichzeitig die Immunreaktion in eine gewünschte Richtung dirigiert. Die Mutationen schränken die intrazelluläre Motilität der Bakterien und damit ihre Ausbreitung in sekundäre Zellen ein. Dadurch wird die Infektion unter Beibehaltung der Behandelbarkeit durch bekannte Antibiotika auf die ausgesuchten Zielzellen begrenzt.

Aus Sicherheitserwägungen ist es wünschenswert, die intrazelluläre Ausbreitung der TGC-Amme nach der Infektion einzuschränken oder gar zu verhindern. Das genaue Wissen über die intrazelluläre Lebensweise und die Motilität der oben-

5 genannten Bakterien ermöglicht es, definierte, stabile Mutanten mit verminderter Fähigkeit zur Infektion des TGC-Wirtes zu erzeugen.

Bei *L. monocytogenes* betreffen die in diesem Sinne attenuierten Mutationen zum Beispiel das *hly*-Gen mit der Folge der Blockade der Infektion der ersten Zelle. Als ein Beispiel für die Ausschaltung dieses Pathogenitätsfaktors ist der Stamm *L. monocytogenes* EGD *hly*_{D491A} hinterlegt worden und hat die Hinterlegungsnummer DSM 11881 erhalten.

15 Ein anderes Beispiel für die Verminderung der Pathogenität von *L. monocytogenes* sind Mutationen im *actA*-Gen oder die Deletion von Regionen, die für die Interaktion zwischen *actA* und dem Wirtszellprotein VASP erforderlich sind, mit der Folge, daß

20 die intrazelluläre Motilität blockiert ist. Schließlich gibt es auch Mutationen des *plcB*-Gen, wodurch den Bakterien die Möglichkeit genommen wird, sich in eine zweite Zelle hinein auszubreiten. Der hinterlegte Stamm *L. monocytogenes* EGD Delta *actA* Delta *plcB* ist ein Beispiel für eine doppelte Mutation,

25 in der sowohl das *actA*-Gen als auch das *plcB*-Gen ausgeschaltet sind. Er trägt die Hinterlegungsnummer DSM 11882.

Außerdem ist es auch möglich, in *L. monocytogenes* das Wildtyp-Listeriolysin-Gen gegen ein mutiertes Allel auszutauschen.

30 Dann wird die Eigenschaft des Listeriolysin, eine Apoptose in verschiedenen Wirtszellen zu induzieren und eine starke T-Zellvermittelte Immunantwort zu generieren, eingeschränkt.

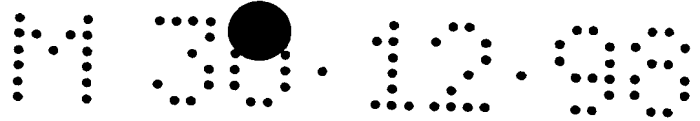


c) Dritte Ebene der Sicherheit - Überleben in der Umwelt

Die TGC-Ammen können dem TGC-Wirt entweder durch Injektion oder durch perorale Gabe appliziert werden. Bei peroraler Gabe
5 kann es zu einem Überangebot an Bakterien und dadurch zur Ausscheidung von Bakterien kommen, die vom Organismus nicht aufgenommen werden. Damit diese ausgeschiedenen Bakterien keine Chance haben, in der Umwelt zu überleben, können die TGC-Sicherheitsstämme zusätzliche Mutationen enthalten, die das Wachstum der Bakterien in der Umwelt verhindern.

Als ein Beispiel hierfür wird das Ausschalten des cspL-Gens (cold shock protein der Listerien) angeführt. Das hat zur Folge, daß die Bakterien bei Temperaturen unter 20° nicht mehr
15 wachsen können. Das Wachstum und die Infektionsfähigkeit bei 37°C sind nicht beeinträchtigt, werden allerdings bei gleichzeitigen Mutationen gemäß a) und b) zusätzlich moduliert. Das cspL-Gen, das in den erfindungsgemäß eingesetzten Sicherheitsstämmen deletiert ist, ist im Sequenzprotokoll als
20 SEQ. ID No. 2 dargestellt. Ein entsprechender cspL-deletierter Stamm ist unter der Bezeichnung L.monocytogenes EGD Delta cspL1 bei der DSM unter der Nr. 11883 hinterlegt worden.

Die erfindungsgemäß eingesetzten TGC-Sicherheitsstämme können
25 nur auf speziellen Wachstumsmedien angezüchtet werden. Die Wachstumstemperatur muß dabei über 37°C betragen, unter 20°C ist ein Wachstum unmöglich. Die Bakterien besitzen eine eingeschränkte Pathogenität und vermögen nur noch in begrenzte, eng umschriebene Areale des TGC-Wirtes vorzudringen.
30 Damit wird die Sicherheit des Systems für Mensch und Umwelt garantiert. Die TGC-Ammen sind außerhalb der artefiziellen Medien, hier speziell in der Wirtszelle, nicht mehr wachstumsfähig. Diese eingeschränkte intrazelluläre Lebensfähigkeit ist gleichzeitig eine Voraussetzung für die Freisetzung der TGC-



DNA in der Wirtszelle und damit für die Induktion der somatischen Transgenität im TGC-Verfahren.

5 Die hier aufgeführten Beispiele für *L.monocytogenes* sind auf andere intrazellulär vitale Bakterien oder Bakterien übertragbar, die erst durch Aufrüstung mit Pathogenitätsfaktoren zu intrazellulären Erregern gemacht werden. Dies gilt insbesondere für Bakterien der Gattungen *Aeromonas*, *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Clostridia*, *Enterobacteriaceae* (besonders *E.coli*, *Salmonellen*, *Shigellen*, *Yersinien*), *Mycobacterium*, *Renibacterium* und *Rhodococcus*. Eine in diesem Sinn aufgerüsteter TGC-Sicherheitsstamm ist zum Beispiel *Bacillus subtilis*, der zusätzlich mit dem *Listeriolysin* aus *L.monocytogenes* ausgerüstet ist.

15

Eine wichtige Voraussetzung für die Übertragung von DNA selbst in "abgelegene" Körperzellen ist der Schutz der DNA auf dem Weg bis zur Zielzelle oder dem Zielgewebe oder dem Zielorgan. Die Fähigkeit intrazellulär vitaler Bakterien wie *L.monocytogenes* zur intrazellulären Ausbreitung ist eine ideale Eigenschaft, Gene in abgelegene Zellen, in tiefere Gewebe und Organe zu transportieren. Nach erfolgreichen Transfer der TGC-DNA in die Zielzelle verstirbt der Bote, die TGC-Amme, oder kann spätestens durch eine Antibiotika-Therapie ausgeschaltet werden.

25

Beispiel 2 - Beschreibung der TGC-Amme

30 TGC-Vektoren sind episomale DNA, zum Beispiel Plasmide mit geringer Aufnahmefähigkeit von Fremd-DNA (pMB-Abkömmlinge, die für einzelne Gene ausreicht), oder mit größerer DNA-Aufnahmefähigkeit (wie bei P1- oder F-Plasmiden), um die somatische Transgenität für komplexe Biosynthese-Wege zu schaffen.

In allen Fällen handelt es sich um Plasmide, die in den zur genetischen Veränderung und zur Anzucht für das TGC-Verfahren eingesetzten Wirten repliziert werden. Als Beispiel für einen Zwischenwirt, in dem genetische Bausteine konstruiert werden können, eignen sich E.coli oder andere in der rekombinanten DNA-Technologie üblicherweise eingesetzte Bakterien. Als TGC-Sicherheitsstamm eignet sich unter anderem L.monocytogenes oder die anderen obengenannten Bakterien, die als TGC-Amme fungieren. Um diese Bedingung zu erfüllen, enthalten die Plasmide die wirtsspezifischen Plasmid-Replikon-Sequenzen. Bei der Erzeugung der rekombinanten DNA müssen transformierte von "nackten" Wirtszellen unterschieden werden. Als Selektionsprinzipien können dabei die gängigen Antibiotikaresistenzgene eingesetzt werden.

15

Beispiel 3 - Transformation von L.monocytogenes-Sicherheitsstämmen zu TGC-Ammen

Die Transformation von L.monocytogenes erfolgt nach einem modifizierten Protokoll von Park und Stewart [40].

20

Dazu werden Bakterien bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,2$ angezogen. Dem Anzuchtsmedium wird Ampicillin ($10\mu\text{g/ml}$) und 1 mM Glyzin zugegeben. Es erfolgt dann eine weitere Vermehrung bis zu einer OD_{600} von 0,8 bis 1,0. Die Zellen werden durch Abzentrifugation geerntet und in 1/250 Vol. kaltem Elektroporationspuffer (1 mM Hepes, pH 7,10; 0,5 M Sucrose) aufgenommen. Als Vorbereitung zur Elektroporation werden die Bakterien bis zu viermal gewaschen.

25
30

Zur Elektroporation werden 50 μl der vorbereiteten Zellen in eine Elektroporationskuvette gegeben, die Elektroporation erfolgt bei 10 kV/cm, 400 Ohm, 25 μF .

Danach kommen die Zellen sofort auf Eis und werden in 10-fachem BHI-Medium aufgenommen und für 2 Stunden bei 37°C unter vorsichtigem Schütteln bebrütet. Nach dieser Zeit wird das Medium ausplattiert und bei der gewünschten Temperatur bebrütet. Die Effizienz der Transformation nach dieser Methode beträgt 10^4 bis 10^5 Transformaten pro μg eingesetzter Plasmid DNA.

Beispiel 4 - Beschreibung der Anzucht von TGC-Ammen zum Einsatz im TGC-Verfahren

Listerien wurden bevorzugt in der Brain-Heart-Infusion Broth zum Beispiel BHI der Firma Difco angezüchtet. Alternativ und für spezielle Anwendungen (radioaktive Markierung listerieller Proteine) können die Bakterien in Tryptic Soy broth (TSB) oder in Listerien Minimal Medium (LMM) gezüchtet werden [36]. Die Bakterien werden abzentrifugiert und mehrfach im geeigneten Transfer-Medium, zum Beispiel einem Bicarbonat-haltigen Puffer, gewaschen.

20

Derart vorbereitete Bakterien können unter Zusatz von 15% Glycerin Lösung bei -80°C für mindestens 6 Monate aufbewahrt werden, bevor sie in das TGC-Verfahren eingesetzt werden.

25 Beispiel 5 - TGC-Verfahren - Verfüttern der TGC-Ammen

Zur Einleitung des TGC-Verfahrens wird den Tieren für einige Stunden das Trinkwasser entzogen. Die (TGC-Ammen: TGC-DNA im gewünschten TGC-Stamm) werden in einem Bicarbonat-haltigen Puffer geeigneter Konzentration aufgenommen und den Tieren oral, durch Inhalation oder per Injektion (parenteral, intramuskulär, intraperitoneal oder direkt in das gewünschte Zielorgan) verabreicht. Die Art der Applikation richtete sich nach dem physiologischen Infektionsweg der entsprechenden TGC-Amme. Die Auswahl des Keimes der als TGC-Sicherheitsstamm

35

M 30.12.99

eingesetzt wird, richtet sich nach Zielorgan und wird entsprechend des Infektionsweges und entsprechend des Organotropismus des jeweiligen Bakteriums festgesetzt. Die Dosis an Bakterien wird so gewählt, daß die gewünschte organotrope Einschleusung der TGC-Amme erzielt wird. Die Menge der applizierten Bakterien richtet sich dabei nach dem jeweiligen Bakterium, ist aber auch vom Wirt und dem Zielorgan abhängig.

Beispiel 6 - Durchführung der somatischen Gentherapie

Als Beispiele für eine somatische Gentherapie sind hier aufgeführt:

- 15 - Die Therapie der Cystischen Fibrose (CF): Dazu muß der Keim dem zu therapierenden Patienten durch Inhalation verabreicht werden. Bei dem Bakterium handelt es sich vorzugsweise um einen Keim, der über Tröpfcheninfektion übertragen wird. In dem Bakterium befindet sich das CFTR-Gen, das den bei der CF maßgeblichen Defekt kurieren kann. Das Bakterium dringt in die Säulenzellen des Luftweges (airway lumen-facing columnar cells) ein und transfiziert diese mit der CFTR-DNA integriert in den TGC-Vektor. Die Zellen werden somatisch transgen, der Defekt wird kuriert.
- 20
- 25
- Durch somatische Gentherapie mit dem humanen β -Globulinsgens kann die β -Thalasaemie behandelt werden. Dazu werden ex vivo Stammzellen der haematopoetischen Reihe mit einem TGC-Sicherheitsstamm infiziert, der das β -Globulingen auf die Stammzelle überträgt. Durch Behandlung der Zellen in der Zellkultur wird das infizierende Bakterium eliminiert und die transgene Zelle für die Rückübertragung auf den Menschen vorbereitet. Diese Übertragung erfolgt durch intravenöse Gabe.
- 30
- 35

M 30.12.90

- 26 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

5 - Bei der Therapie des Hurler Syndroms werden primitive CD34-positive Zellen des Knochenmarks mit dem α -L-Iduronidase-Gen transfiziert. Der Weg der Gentherapie und der Rückübertragung der Zellen auf den Patienten entspricht dem im vorherigen Punkt.

- Bei der Gentherapie der Fanconi Anaemie wird das Gen der Fanconi Anaemie Komplementationsgruppe C (FACC) zur somatischen Gentherapie eingesetzt. Zielzellen der Infektion mit der TGC-Amme sind hierbei erneut CD34-positive Zellen des Knochenmarks.

Beispiel 7 - Kontrolle für den Erfolg der induzierten somatischen Transgenität

15

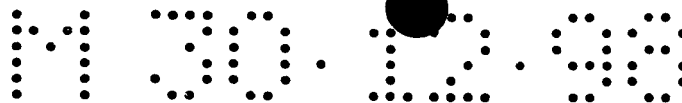
20 Nach dem Transfer der TGC-DNA in den TGC-Wirt ist der Erfolg des TGC-Verfahrens nachzuweisen. Dazu eignen sich immunologische Nachweise des Genproduktes (Proteins) durch Immunoassays wie den ELISA, den Immunoblot oder andere bekannte Nachweise, die auf einer Antigen-Antikörperreaktion beruhen. T-Zell-

25

30 Handelt es sich bei dem produzierten Protein um ein Enzym, so kann dessen biologische Aktivität in Form der enzymatischen Aktivitätstestung erfolgen. Besitzt das Protein zusätzlich eine biologische Aktivität, so wird die Leistungsfähigkeit des gebildeten Proteins durch biologische Assays abgerufen.

35

Für Proteine, die eine passive oder aktive Immunisierung des TGC-Wirtes induzieren, wird die Protektion gegenüber dem auslösenden Agens getestet. Es kann sich zum Beispiel um die Verhinderung der Besiedlung, um die Infektion oder apparente



Erkrankung des Versuchstieres nach Belastung mit dem pathogenen Organismus (Bakterium oder Virus) handeln.

Beispiel 8 - Ernte des Proteins

5

Die Gewinnung des produzierten Proteins erfolgt durch Techniken, die jeder in der Landwirtschaft tätigen Person bekannt sind:

- ist der TGC-Wirt eine Kuh oder ein anderes laktierendes Nutztier und das Euter das infizierte Organ, so werden die bekannten Techniken des Melkens eingesetzt;
- wenn Geflügeltiere wie Hühner als TGC-Wirt eingesetzt wurden, so werden die Eier gesammelt und der Protein-Reinigung zugeführt;
- die Aufarbeitung von Proteinen aus Organen, deren Produkte nicht nach außen abgegeben werden, erfolgt durch die Gewinnung des entsprechenden Organs, wozu in der Regel eine Schlachtung nötig sein wird, zum Beispiel bei Fischen;
- ist das Blut das somatisch transgene Gewebe, so wird das gewünschte Produkt nach Venenpunktion aus dem Blut oder seinen Zellen gewonnen und mit dem Fachmann bekannten Methoden aufgereinigt.

15

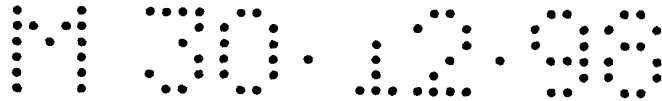
20

25

Beispiel 9 - Anreinigung des Proteins

30

Eine Vorreinigung des zu produzierenden Proteins erfolgt durch Trennungungsverfahren, die sich primär physikalischer oder physikochemischer Methoden bedienen. Dazu gehören Fällungen der Proteine mit Salzen (zum Beispiel Ammoniumsulfat), mit



Säuren (zum Beispiel Trichloressigsäure) oder unter Einwirkung von Hitze oder Kälte.

5 Eine grobe Trennung wird auch mittels der Säulenchromatographie erreicht. Alle hier eingesetzten Verfahren richten sich sehr stark nach den primären Medien, in denen sich das jeweilige Protein anreichert. So sind zum Beispiel für die Aufarbeitung von Milch oder Eiern in der Industrie viele Methoden bekannt, die auch auf die hier geschilderte Erfindung anwendbar sind. Gleiches gilt für die Aufarbeitung von Blut als somatisch-transgenes Gewebe. Hier kann auf die Erfahrungen auf die Transfusionsmedizin, spezielle auf die Aufarbeitung und Reinigung von Blutgerinnungsfaktoren zurückgegriffen werden.

15

Beispiel 10 - Reinigung des Proteins

Zur endgültigen Reinigung der Proteine sind alle Methoden einsetzbar, die für konventionelle Reinigungen von Proteinen
20 Anwendung finden. Dazu gehören

25

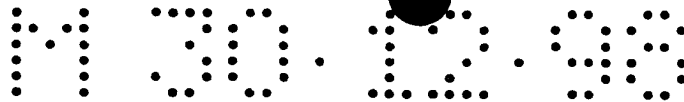
- die Reinigung mittels Affinitätschromatographie zum Beispiel unter Ausnutzung der Rezeptor-Ligand Interaktion;

30

- die Darstellung von Fusionsproteinen mit sog. "Tags", die zur spezifischen Interaktion mit einer Matrix der Chromatographie eingesetzt werden können (zum Beispiel Poly-Histidin-Tag und Nickel-Säulen-Chromatographie; die Streptavidin-Biotin Technologie der Affinitätsreinigung. Die Tags können durch späteren Proteasen-Verdau wieder entfernt werden;

35

- die Reinigung mittels spezifischer Antikörper (Immunitätschromatographie);



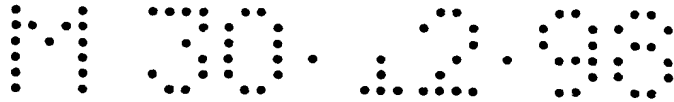
- 29 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

- die Ausnutzung natürlicher Affinitäten zwischen dem Zielprotein und anderen Proteinen, Kohlehydraten oder anderen Bindungspartnern wie im Fall des Toxin A von Clostridium difficile, dessen Bindungsfähigkeit an Thyroglobin bei 4° und dessen anschließender Elution durch Temperaturerhöhung auf 37°C.

Beispiel 11 - Produktion von TGC-Proteinen:

- Die Liste der durch das TGC-Verfahren generierbare Proteine ist theoretisch unbegrenzt und umfaßt vor allem den Bereich der Hormone, Regulationsfaktoren, Enzyme, Enzyminhibitoren, humane monoklonale Antikörper sowie die Herstellung von Oberflächenproteinen pathogener Mikroorganismen oder viraler Hüllproteine zur ungefährlichen Herstellung diagnostischer Tests und verträglicher Impfstoffe. Es handelt sich dabei sowohl um Massenartikel wie humanes Serumalbumin als auch um Proteine, die in geringen Mengen eingesetzt werden wie Hirudin, Blutgerinnungsfaktoren, Antigene zur Tumorphylaxe und zur aktiven Immunisierung (zum Beispiel Papilloma-Antigen) sowie um Antikörper zur passiven Immunisierung.



- 30 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE**Literaturverzeichnis:**

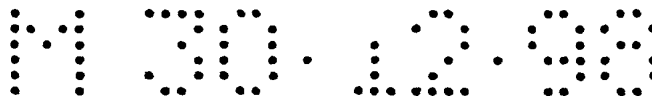
- 5 1. Cossart P. und B.B. Finlay "Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens Science 276: 718-725.
2. Falkow, S., Isberg, R.R. und Portnoy D.A. (1992) The interaction of bacteria with mammalian cells Ann. Rev. Cell Biol. 8:333-63.
3. Weinberg, A.N. Zoonoses S. 291-2795; In Principle and Practice of Infectious Diseases, Eds. Mandell, 15 Douglas und Bennett, J.E. und Dolin R. Churchill Linvingstone New York, 1995.
4. Farber J.M. und Peterkin, P.J. (1991) Listeria monocytogenes - a foodborne pathogen Microbiol. 20 Rev. 55: 476-511.
5. Thoen C.O. (1994) Tuberculosis in wild and domestic animals pp. 157-62, in Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control ; ASM, Washington DC 20005. 25
6. von Hase, U., Pulz, M., Windorfer, A: EHEC in Niedersachsen, Januar 1995 - August 1997. Niedersächs. Ärztebl (1997) 20-23 u 38-40.
- 30 7. Swaminathan B., Rocourt J., und Bille J.. (1995) Listeria. In: Manual of Clinical Microbiology. Eds: Murray, P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., und Yolken R.H. S.341-348. ASM-Press Washington DC.

M 30. 12. 98

- 31 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

8. Hof, H., Nichterlein, T. und Kretschmar, M. (1997) Management of Listeriosis. Clin. Microbiol. Rev. 10: 345-357.
- 5 9. Chakraborty, T. und Wehland, J (1997) The host cell infected with *Listeria monocytogenes* pp. 271-290; in Host response to intracellular pathogens, Ed. S.H.E. Kaufmann R.G. Landes co., Austin, USA.
10. Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. und Cossart, P. (1991) Entry of *L. monocytogenes* is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci Cell: 65; 1127-1141.
- 15 11. Lingnau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nichterlein, T., Wehland, J. und T. Chakraborty (1995) Expression of *inlA* and *inlB* in *L. monocytogenes* EGD, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and - independent mechanisms Infect. Immun. 63: 3896-3903.
- 20 12. Alvarez-Dominguez, C., Carasco-Martin, E. und Levya-Cobian F (1993) Role of complement component C1q in phagocytosis of *L. monocytogenes* by murine macrophage-like cell lines . Infect. Immun. 61: 3664-3672.
- 25 13. Dunne, D.W., Resnick, D., Greenberg, J., Krieger, M. und Joiner, K.A. (1994) The type I macrophage scavenger receptor binds to Gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 1863-7.
- 30 35



14. Gaillard, J-L, Berche, P. und Sansonetti, PJ (1986)
Transposon mutagenesis as a tool to study the role
of hemolysin in virulence of *Listeria monocytogenes*
Infect. Immun. 52: 50-55.
- 5
15. Theriot, J.A., Rosenblatt, J., Portnoy, D.A.,
Goldschmidt-Clermont, P.J. und Mitchison, T.J.
(1994) Involvement of profilin in the actin-based
motility of *Listeria monocytogenes* in cells and
cell-free extracts. Cell 76: 505-517.
16. Chakraborty, T., Ebel, F., Domann, E., Niebuhr, K.,
Gerstel, B., Pistor, S., Temm-Grove, CJ, Jockusch,
BM., Reinhard, M., Walter, U. und Wehland, J.
15 (1995) A focal adhesion factor directly linking
intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and
Listeria ivanovii to the actin-based cytoskeleton
of mammalian cells EMBO J. 14: 1314-21.
- 20 17. Vazquez-Boland, J.A., Kocks, C., Dramsi, S.,
Ohayon, H., Goeffroy, C., Mengaud, J. und Cossart,
P. (1992) Nucleotide sequence of the lecithinase
operon of *L. monocytogenes* and possible role of
lecithinase in cell-to-cell spread. Infect. Immun.
25 60: 219-30.
18. L'Hopital, S.J., Marly, J., Pardon, P. und Berche,
P. (1993) Kinetics of antibody production against
listeriolysin O in sheep with listeriosis. J Clin.
30 Microbiol. 31: 1537-40.
19. Domann, E., Zechel, S., Lingnau, A., Hain, T.,
Darji, A., Nichterlein, T., Wehland, J. und Chakra-
borty, T. (1997) Identification and characteriza-
35 tion of a novel PrfA-regulated gene in *Listeria*

M 30.12.97

- 33 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

monocytogenes whose product, IrpA, is highly homologous to internalin proteins, which contain leucine-rich repeats. Infect. Immun. 65: 101-9.

- 5 20. Grenningloh, R., Darji, A., Wehland, J., Chakraborty, T. und Weiss, S. (1997). Listeriolysin and IrpA are major protein targets of the human humoral response against *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. 65: 3976-3980, 1997.
- 15 21. Shen, H., Slifka, M.K., Matloubian, M., Jensen, E.R., Ahmed, R. und Miller, J.F. (1995) Recombinant *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vehicle for the induction of protective anti-viral cell-mediated immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 3987-91.
- 20 22. Slifka, M.K., Shen, H., Matloubian, M., Jensen, E.R., Miller, J.F. und Ahmed, R. (1996) Antiviral cytotoxic T-cell memory by vaccination with recombinant *Listeria monocytogenes*. J. Virology 70: 2902-10.
- 25 23. Jensen, E.R., Selvakumar, R., Shen, H., Ahmed, R., Wettstein, F.O. und Miller J.F. (1997) Recombinant *Listeria monocytogenes* Vaccination Eliminates Papillomavirus-Induced Tumors and Prevents Papilloma Formation from Viral DNA. J. Virol. 71: 8467-8474.
- 30 24. Schafer, R., Portnoy, D.A., Brassell, S.A. und Paterson, Y. (1992). Induction of a cellular immune response to a foreign antigen by a recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine. J. Immunol. 149: 53-9.
- 35

M 30. 12. 98

- 34 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

- 5
25. Ikonomidis, G., Paterson, Y., Kos, F.J. und Portnoy, D.A. (1994). Delivery of a viral antigen to the class I processing and presentation pathway by *Listeria monocytogenes*. J. Exp. Med. 180: 2209-18.
26. Frankel, F.R., Hegde S., Lieberman, J. und Paterso, Y. (1995) Induction of cell-mediated immune responses to human immunodeficiency virus type 1 Gag protein by using *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vector. J. Immunol. 155: 4775-82.
- 15
27. Pan, Z.K., Ikonomidis, G., Lazenby, A., Pardoll, D. und Paterson, Y. (1995) A recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine expressing a model tumour antigen protects mice against lethal tumour cell challenge and causes regression of established tumours. Nature Med. 1: 471-7.
- 20
28. Dramsi, S., Kocks, C., Forestier, C. und Cossart, P. (1993) Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *L. monocytogenes* is regulated by bacterial growth, temperature and the pleiotropic activator, prfA. Mol. Microbiol. 9: 931-41.
- 25
29. Alvarez-Dominguez, C., Vazquez-Boland, J.A., Carrasco-Marin, E., Lopez-Mato, P. und Leyva-Cobian F. (1997). Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. Infect. Immun. 65: 78-88.
- 30
30. Domann, E., Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wächter, M., Wuenscher, M. und Chakraborty, T. (1992) A novel
- 35

M 30. 12. 98

- 35 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

bacterial virulence gene in *L. monocytogenes* required for host microfilament interaction with homology to the proline rich region of vinculin. EMBO. J. 11: 1981-1990.

5

31. Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, M. und Cossart, P. (1992) *Listeria monocytogenes* induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. Cell 68: 521-31.

32. Armstrong, D. *Listeria monocytogenes* (1995) In Principle and Practice of Infectious Diseases, Eds. Mandell, Douglas und Bennett, J.E. und Dolin R.. S.1880-1885. Churchill Livingstone New York, 1995.

15

32a. Boucher, R.C. (1996). Current status of CF gene therapy. Trends in Genetics 12: 81-84.

32b. Bank A. (1996). Human somatic cell gene therapy. BioEssays 18: 999-1007.

20

33. O'Callaghan D, Maskell D, Tite J, Dougan G (1990). Immune responses in BALB/c mice following immunization with aromatic compound or purine-dependent *Salmonella typhimurium* strains. Immunology 69:184-189.

25

34. Tacket, C.O., Sztein, M.B., Losonsky, G.A., Wasserman, S.S., Nataro, J.P., Edelman, R., Pickard, D., Dougan, G., Chatfield, S., und Levine, M.M. (1997). Safety of Live Oral *Salmonella typhi* Vaccine Strains with deletions in htrA and aroC, aroD and immune response in humans. Infect. Immun. 65: 452-456.

35

11.30.12.98

- 36 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

- 5 35. Curtiss III, R. (1989) Attenuated *Salmonella* strains as live vectors for the expression of foreign antigens. In New generation vaccines: The molecular approach (ed. M.M. Levine und G. Woodrow) p. 161. Marcel Dekker, New York.
36. Hopkins, S., Kraehenbuhl, J.-P., Schödel, F., Potts, A, Peterson, D., De Grandi, P., und Nardelli-Haeffliger, D. (1995). A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. Infect. Immun. 63: 3279-3286.
- 15 37. Berkmen, M., Benedik, MJ., und Blasi, U. (1997). The *Serratia marcescens* NucE protein functions as a holin in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 179: 6522-6524.
- 20 38. Diaz, E., Munthali, M., de Lorenzo, V., und Timmis KN (1994). Universal barrier to lateral spread of specific genes among microorganisms. Mol. Microbiol. 13: 855-861.
- 25 39. Hohmann, El., Oletta, CA., Loomis, WP, und Miller, SI (1995). Macrophage-inducible expression of a model antigen in *Salmonella typhimurium* enhances immunogenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 92:2904-2908.
- 30 40. Park S.F. und Stewart G.S. (1990). High-efficiency transformation of *Listeria monocytogenes* by electroporation of penicillin-treated cells. Gene 94:129-132.
- 35 41. Premaratne, R.J., Lin, W.J. und Johnson E.A. (1991) Development of an improved chemically defined minimal medium for *L. monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3046-48.

M 30. 12. 98

- 37 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE**Patentansprüche:**

- 5 1. TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität in einem animalen Wirt, **dadurch gekennzeichnet**, daß Bakterien, die eine Fremd-DNA tragen, die in einem episomalen Vektor integriert und zur späteren Transkription und Expression vorbereitet ist, bei der Infektion von Zellen, eines Gewebes oder eines Organs in Kultur oder eines Organs oder eines ganzen Organismus im Wirt ihre genetische Information freisetzen und damit die Expression von Fremdprotein beeinflusst.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1 zur somatischen Gentherapie, **dadurch gekennzeichnet**, daß die durch die bakterielle Infektion in dem Wirtsorganismus eingeführte Fremd-DNA dort die Bildung eines dem Wirtsorganismus fehlenden Proteins veranlaßt oder durch die Erzeugung von einzel- oder doppel-
- 20 strängiger Nukleinsäure die Bildung eines Proteins im Wirtsorganismus erhöht, vermindert oder verhindert.
- 25 3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß Bakterien der Gattungen Aeromonas, Bartonella, Brucella, Campylobacter, Clostridia, Enterobacteriaceae, Listeria, Mycobacterium, Renibacterium, Rhodococcus oder Bakterien aus mit ihnen genetisch oder biochemisch verwandten Gattungen eingesetzt werden, die intrazellulär im eukaryonten Wirtsorganismus lebensfähig und vorzugweise attenuiert sind,
- 30 so daß sie in vitro auf Spezialmedien wachsen, ihr Wachstum in vivo aber kontrolliert und vom Experimentator bestimmt werden kann.
- 35 4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß als attenuierte Bakterien Mutanten eingesetzt werden, die

11.12.97

- 38 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

auxotroph sind, unter normalen Umweltbedingungen nicht wachsen können und die durch genetische Modifikation pathogener Bakterien eine verminderte Pathogenität aufweisen oder aber, bei physiologisch apathogenen Bakterien, mit zusätzlichen Faktoren zur Erreichung einer intrazellulären Invasivität ausgestattet sind.

5 5. Bakterienstamm, der für das TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität **dadurch geeignet ist**, daß er eine in einem Vektor integrierte und zur späteren Transkription und Expression vorbereitete Fremd-DNA trägt, die unter der Kontrolle regulatorischer Elemente steht, die aus dem zu infizierenden Zielorgan stammen oder für das Zielorgan optimiert sind.

15 6. Bakterienstamm nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß er zu einem Sicherheitsstamm mutiert worden ist, indem das *dapE*-Gen deletiert ~~oder deletiert~~ oder die Bakterien auf eine andere Weise auxotroph gemacht worden sind.



20 7. Bakterienstamm nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß er zu einem Sicherheitsstamm mutiert worden ist, indem das *actA*-Gen und/oder das *plcB*-Gen oder *Hly*-Gen oder andere an der Virulenz beteiligte Gene deletiert oder blockiert sind.

25 8. Bakterienstamm nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß er zu einem Sicherheitsstamm mutiert worden ist, indem das *cspL*-Gen deletiert oder blockiert ist.

30 9. Verfahren zu Infektion eines humanen oder tierischen Gesamtorganismus durch Aufbringen eines Bakterienstammes gemäß Ansprüchen 5 bis 8 auf eine Schleimhaut oder durch parenterale oder direkt in das Zielorgan durchgeführte Injektion einer von dem Bakterienstamm infizierten Zelle oder eines von dem Stamm infizierten Gewebes.

M 30.12.98

- 39 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine ausgewählte Zelle, ein ausgewähltes Gewebe oder ein Organ gezielt bakteriell infiziert wird, das daraufhin ein vorbestimmtes Fremdprotein bildet oder sekretiert, und das Fremdprotein aus Zelle, Gewebe oder Organ selber, oder aus den von ihnen ausgeschiedenen Produkten nach an sich bekannten Reinigungsverfahren gewonnen wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Expression von Fremdprotein im Euter von Milch-produzierenden Tieren wie Kuh, Schaf, Ziege, Pferd oder anderen Säugetieren, oder in Eiern von Geflügeltieren, oder im Blut oder anderen Geweben von Nutztieren allgemein (z.B. Fischen) durch die Infektion mit Bakterien induziert wird.

15

12. Transgene Nutztiere und speziell Säugetiere, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zellen eines oder mehrerer seiner Gewebe oder Organe durch Anwendung des Verfahrens nach Anspruch 1 genetisch verändert sind.

11.30.12.98

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

Prof. Dr. Trinad Chakraborty
Seltersweg 85

35390 Gießen

Dr. Christoph von Eichel-Streiber
Bingerweg 15

55444 Schweppenhäusen

Zusammenfassung:

TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität

Es wird ein TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität in einem animalen Wirt beschrieben, bei dem Bakterien, die eine Fremd-DNA tragen, die in einem episomalen Vektor integriert und zur späteren Transkription und Expression vorbereitet ist, bei der Infektion von Zellen, eines Gewebes oder eines Organs in Kultur oder eines Organs oder eines ganzen Organismus im Wirt ihre genetische Information freisetzen und damit die Expression von Fremdprotein beeinflussen. Hierfür werden attenuierte Bakterien-Mutanten eingesetzt, die auxotroph sind, unter normalen Umweltbedingungen nicht wachsen können und durch genetische Modifikationen pathogener Bakterien eine verminderte Pathogenität aufweisen. Das Verfahren kann sowohl zur Erzeugung von Fremdproteinen als auch zur somatischen Gentherapie eingesetzt werden.

M 30. 1. 98

- 1 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

SEQUENZPROTOKOLL

5 ALLGEMEINE ANGABEN

ANMELDER:

1. Prof. Dr. Trinad Chakraborty
Seltersweg 85
35390 Gießen
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: 0641/76 536
Fax : 0641/99 41 259
2. Privatdozent
Dr. Christoph von Eichel-Streiber
Bingerweg 15
55444 Schweppenhäusen
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: 06724/33 98
Fax : 06724/33 98

15

20

25

BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten,
somatischen Transgenität

30

ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

ZUSTELLANSCHRIFT:

Patentanwälte
Dr. Rainer A. Keil
Ludwig R. Schaafhausen
Nanno M. Lenz
Dr. K.-H. Meyer-Dulheuer
Eysseneckstraße 31
D-60322 Frankfurt am Main

35

M 30. 12. 98

- 2 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

COMPUTERLESBARE FASSUNG

DATENTRÄGER : Diskette
COMPUTER : IBM PC compatible
5 OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
SOFTWARE : Word Perfect 6.0

Angaben zur Sequenz ID-No 1:

Länge : 1260 Basenpaare
Art : Nukleinsäure und davon abgeleitete
Aminosäuresequenzen
Strangform : Einzelstrang
Topologie : linear
15 Herkunft : Listeria monocytogenes Stamm EGD
Serotyp 1/2a
Merkmal : Sequenz des dapE Gens, das eines der
für die Synthese der Diaminopimelin-
säure notwendigen Schlüsselenzyme
ist. Die Aminosäure sequenz ist hoch
20 homolog zu N-succinyl-L-diaminopime-
lic acid desuccinylase (dapE) unter
anderem aus Escherichia coli, Bacil-
lus subtilis, Lactobacillus spp.,
25 Mycobacterium tuberculosis.

Aminosäuresequenz: 318 Aminosäuren
Nukleotidsequenz : 1260 Nukleotide

30

1 TGCCTTTATA GAGAACGGGA AAACATAGAG TGGAATTCAT AGAAAGAGGG
51 CGTGAAATAT GGACCAACAA AAAAAGATTC AAATTTTAAA GGACTTG GTA
101 AATATTGATT CGACTAATGG GCATGAAGAA CAAGTTGCGA ACTATTTGCA
151 AAAGTTGTTA GCTGAACATG GTATTGAGTC CGAAAAGGTA CAATACGACC

- 3 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

201 TAGACAGAGC TAGCCTAGTA AGCGAAATTG GTTCCAGTAA CGA GAA GGT T
R E G

251 TG GCA TTT TCA GGG CAT ATG GAT GTA GTT GAT GCG GGT GAT GTA TCT AAG
L A F S G H M D V V D A G D V S K -

301 TGG AAG TTC CCA CCT TTT GAA GCG ACA GAG CAT GAA GGG AAA CTA TAC GG
W K F P P F E A T E H E G K L Y G -

351 A CGC GGC GCA ACG GAT ATG AAG TCA GGT CTA GCG GCG ATG GTT ATT GCA A
R G A T D M K S G L A A M V I A -

401 TG ATT GAA CTT CAT GAA GAA AAA CAA AAA CTA AAC GGC AAG ATC AGA TTA
M I E L H E E K Q K L N G K I R L -

451 TTA GCA ACA GTT GGG GAA GAG ATC GGT GAA CTT GGA GCA GAA CAA CTA AC
L A T V G E E I G E L G A E Q L T -

501 A CAA AAA GGT TAC GCA GAT GAT TTA CAT GGT TTA ATC ATC GGC GAA CCG A
Q K G Y A D D L H G L I I G E P -

551 GT GGA CAC AGA ATC GTT TAT GCG CAT AAA GGT TCC ATT AAT TAT CCC GTT
S G H R I V Y A H K G S I N Y P V -

601 AAA TCC ACT GGT AAA AAT GCC CAT AGT TCG ATG CCG GAA TCT GGT GTG AA
K S T G K N A H S S M P E S G V N -

651 T GCG ATT GAT AAC TTG CTG CTA TTT TAT AAT GAA GTA GAA AAA TTC GTG A
A I D N L L L F Y N E V E K F V -

701 AA TCA GTT GAT GCT ACT AAC GAA ATA TTA GGC GAT TTT ATT CAT AAT GTC
K S V D A T N E I L G D F I H N V

751 ACC GTA ATT GAT GGT GGA AAT CAA GTC AAT AGT ATC CCT GAA AAA GCA CA
T V I D G G N Q V N S I P E K A Q -

801 A CTG CAA GGG AAT ATT CGC TCG ATT CCA GAA ATG GAT AAT GAA ACA GTG A
L Q G N I R S I P E M D N E T V -

851 AA CAA GTG CTA GTG AAG ATT ATC AAT AAG TTA AAC AAA CAG GAA AAT GTG
K Q V L V K I I N K L N K Q E N V -

901 AAT CTG GAA TTA ATA TTT GAT TAT GAT AAA CAA CCA GTA TTT AGT GAT AA
N L E L I F D Y D K Q P V F S D K -

951 A AAT TCG GAT TTA GTC CAC ATT GCT AAG AGC GTA GCA AGC GAC ATT GTC
N S D L V H I A K S V A S D I V

1001 AAA GAA GAA ATC CCA TTA CTC GGT ATT TCC GGA ACA ACC GAT GCA GCA GA
K E E I P L L G I S G T T D A A E -

1051 A TTT ACC AAA GCT AAG AAA GAG TTC CCA GTG ATT ATT TTT GGA CCA GGA A
F T K A K K E F P V I I F G P G -

1101 AC GAA ACC CCT CAC CAA GTA AAC GAA AAT GTT TCT ATA GGA AAT TAT TTG
N E T P H Q V N E N V S I G N Y L -

1151 GAG ATG GTA GAT GTT TAC AAA CGG ATT GCC ACC GAG TTT TTA TCT TGA TGA
E M V D V Y K R I A T E F L S STOP

M 30. 12. 98

- 4 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

1201 AACTTTAACT TTACTTATTT CCCGATATAA AATAAGTAAT TAATAGAAGT
1251 CTAGTATTTG 1260

5 Angaben zur Sequenz ID-No 2:

Länge : 1337 Basenpaare
Art : Nukleinsäure und davon abgeleitete
Aminosäuresequenzen
Strangform : Einzelstrang
Topologie : linear
Herkunft : *Listeria monocytogenes* Stamm EGD
1/2a
Merkmal : Sequenz des "cold shock proteins"
15 cspL; dieses Protein ist für die
Lebensfähigkeit der Listerien bei
niedrigen Temperaturen essentiell.

Aminosäuresequenz: 66 Aminosäuren
20 Nukleotidsequenz : 1337 Nukleotide

1 GAGGCAAGTG GACTAATCAT AAAGTTTTTG GCGATGCAAC TCGGATTTTG
51 GCAGGAGATG CTTTACTAAC GCTCGCTTTT TCTATTTTAG CTGAAGACGA
101 TAATTTATCT TTTGAGACAC GCATTGCTTT GATTAACCAA ATTAGTTTTA
151 GTAGCGGTGC AGAAGGAATG GTTGGTGGTC AACTTGCAGA CTTGGAAGCG
201 GAAAACAAAC AAGTGACGCT AGAAGAGTTA TCATCCATTC ATGCACGAAA
251 AACGGGTGAA TTATTAATTT ATGCTGTAAC CTCTGCAGCA AAAATTGCGG
301 AAGCTGATCC AGAACAAACG AAACGCTTAC GAATTTTTCG AGAGAATATT
30 351 GGGATTGGAT TTCAAATTAG CGACGATATT TTAGATGTAA TTGGTGATGA
401 AACGAAAATG GGTA AAAAGA CAGGGGCCGA CGCTTTTCTG AATAAAAAGTA
451 CCTATCCCGG ATTACTCACG CTTGATGGGG CAAAAGGGC ATTAAATGAG
501 CATGTTACGA TTGCAAAGTC AGCGCTTTCA GGGCATGATT TCGATGATGA
551 AATTCTCTTG AAAGTTGCTG ATTTAATCGC ACTTAGAGAA AATTAATCAT
35 601 AATTATCTAG TAATTTCAAA ATTTTTCAC ATATATAATT CAAATTGATT
651 TGCTTTTCCT AAAATACCGT GTTATACTAA TGTAAGATTA TTTTGTGGG
701 TGAAAGATAC GATTGTGAAC AACTTTCCAT CTCGTGCCGT TAAGCAAGAA

M 30.12.98

- 5 -

KEIL & SCHAAFHAUSEN
PATENTANWÄLTE

751 TAGTAAATAA TTAGTGTGCA TAACACACGA GGAGGAACAT GAAC ATG GAA

M E

801 CAA GGT ACA GTA AAA TGG TTT AAC GCA GAA AAA GGA TTT GGT TTT ATC GA
Q G T V K W F N A E K G F G F I E5 851 A CGC GAA AAC GGT GAC GAT GTA TTC GTA CAT TTC AGC GCT ATC CAA GGC G
R E N G D D V F V H F S A I Q G901 AC GGA TTC AAA TCT TTA GAC GAA GGT CAA GCA GTA ACT TTC GAC GTT GAA
D G F K S L D E G Q A V T F D V E10 951 GAA GGC CAA CGC GGA CCT CAA GCA GCT AAC GTT CAA AAA GCG TAA TTC TA
E G Q R G P Q A A N V Q K A STOP

1001 TTTTTTGAAT AAGAAAAAGC AAATCATTTT GGTGATTTGC TTTTTTATTT

1051 GTCTAAAATT ATTTTACCTT GTTTGGTTTA ATGGCGATTG TTTGCTATAA

1101 TAAGAACAAT TAATCGAGAA AAAAGACCTT GCACGCATTC ATGCGAGTGG

15 1151 CTCTTTGGAA AGTGAGTTGT TTTTATTTGG ATCTTTTAAA GATAAAGGAT

1201 CCTTCCTTTA TGAAGCGATT GGATATACAA GAATTAGAAG CACTTGCAGC

1251 GGATATTCGC GCTTTTTTTAA TTACTTCTAC ATCTAAATCA GGTGGGCATA

1301 TTGGTCCGAA TCTTGGTGTG GTAGAACTAA CGATTGC